AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MECÂNICA E TOXICOLÓGICA DE PREENCHEDORES DE ÁCIDO HIALURÔNICO E SEUS RETICULADORES

Kethelen Emilie Gentil Pavão[1], Juliana Lujan Brunetto[2], Hélida Gomes de Oliveira Barud[3], Débora Barros Barbosa[1,2]

[1]Programa de Pós-Graduação em Ciências – Área de Biomateriais, Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, São Paulo, Brasil, (kethelen.gentil@unesp.br)

[2]Departamento de Prótese e Periodontia, Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), Bauru, São Paulo, Brasil

[3]Biosmart Nanotechnology, Araraquara, São Paulo, Brasil

[4]Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese,FOA UNESP,Araçatuba,São Paulo,Brasil.

Resumo: O ácido hialurônico (AH) é amplamente utilizado em preenchedores dérmicos devido à sua biocompatibilidade e capacidade de retenção hídrica. Este estudo avaliou as propriedades reológicas e a citotoxicidade de hidrogéis de AH reticulados com divinilsulfona (DVS). Os resultados demonstraram comportamento viscoelástico adequado para aplicações estéticas e viabilidade celular superior a 80%, indicando ausência de citotoxicidade e potencial para uso biomédico.

Palavras-chave: ácido hialurônico; DVS; reologia; citotoxicidade; biomateriais.

INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um glicosaminoglicano naturalmente presente na matriz extracelular de diversos tecidos, especialmente na pele, onde desempenha funções relacionadas à hidratação, elasticidade e reparação tecidual. Devido à sua elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de retenção hídrica, esse polímero tornou-se um dos biomateriais mais utilizados em procedimentos estéticos minimamente invasivos, sendo amplamente empregado na formulação de preenchedores dérmicos para correção de rugas, sulcos e reposição volumétrica facial (BROWN; JONES, 2005; GOLD, 2007; SCHIRALDI, 2010).

Apesar de suas propriedades biológicas favoráveis, o AH nativo apresenta aplicação clínica limitada devido à sua rápida degradação enzimática e oxidativa nos tecidos, resultando em reduzido tempo de permanência após a aplicação. Estudos demonstram que sua meia-vida na pele pode variar de apenas alguns dias, tornando necessária a modificação química do polímero para prolongar sua estabilidade e durabilidade clínica (DE BOULLE et al., 2013; WONGPRASERT; DREISS; MURRAY, 2022; SCHANTÉ et al., 2012).

Dentre as estratégias utilizadas para aumentar a estabilidade dos preenchedores dérmicos, destaca-se a reticulação química, processo capaz de formar redes tridimensionais mais resistentes à degradação e com propriedades mecânicas superiores. Essa modificação promove melhorias na elasticidade, viscosidade, coesividade e resistência mecânica dos hidrogéis, características fundamentais para sua aplicação clínica e para a manutenção dos resultados estéticos ao longo do tempo (YEOM et al., 2010; KENNE et al., 2013; BORZACCHIELLO et al., 2015).

As propriedades viscoelásticas dos preenchedores de AH são diretamente influenciadas pelo tipo e pelo grau de reticulação empregado. Parâmetros reológicos como módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G"), tangente delta (tan δ) e viscosidade complexa são amplamente utilizados para caracterizar o comportamento mecânico desses materiais, fornecendo informações importantes sobre sua

capacidade de sustentação tecidual, deformação e integração aos tecidos após a aplicação (SUNDARAM et al., 2010; FAGIEN et al., 2019; PIERRE; LIEW; BERNARDIN, 2015).

Atualmente, o 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE) é o principal agente reticulante utilizado em preenchedores comerciais de ácido hialurônico. Entretanto, preocupações relacionadas à presença de resíduos não reagidos e ao potencial citotóxico de agentes reticulantes têm estimulado a busca por alternativas capazes de oferecer desempenho equivalente ou superior, associado a maior segurança biológica. Nesse contexto, a divinil sulfona (DVS) tem sido apontada como uma alternativa promissora, uma vez que é capaz de promover a reticulação eficiente do AH por meio de reações de adição de Michael, formando redes poliméricas estáveis e com propriedades ajustáveis para aplicações biomédicas (SHMIDOV et al., 2020; MONTICELLI et al., 2019; YEOM et al., 2010).

Dessa forma, considerando a crescente demanda por biomateriais mais seguros e eficazes para aplicações estéticas, o presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades reológicas e a citotoxicidade in vitro de preenchedores dérmicos à base de ácido hialurônico reticulados com DVS, contribuindo para o entendimento de seu potencial como alternativa aos sistemas convencionalmente empregados.

MATERIAL E MÉTODOS

Os hidrogéis de ácido hialurônico reticulados com divinilsulfona (DVS) foram submetidos à caracterização reológica e avaliação toxicológica in vitro. As propriedades reológicas foram determinadas utilizando um reômetro rotacional (AR-1500ex, TA Instruments) equipado com geometria de placas paralelas de 40 mm e gap de 500 μm.

Para avaliação das propriedades viscoelásticas, foram realizados ensaios de varredura de frequência na faixa de 0,01 a 10 Hz, utilizando 15 pontos por década. Os parâmetros analisados incluíram o módulo de armazenamento (G’), relacionado ao comportamento elástico do material, e o módulo de perda (G’’), associado à dissipação de energia pelo sistema. Adicionalmente, foi avaliada a tangente de perda (tan δ), utilizada para caracterizar o equilíbrio entre os componentes elástico e viscoso do hidrogel.

O comportamento de escoamento dos hidrogéis foi investigado por meio de ensaios de curva de fluxo, empregando taxas de cisalhamento variando de 0,01 a 1000 s^{-1}, com cinco pontos por década. A partir desses ensaios foi possível determinar a viscosidade aparente e o perfil reológico do material.

Para preparação das amostras destinadas aos ensaios biológicos, os hidrogéis foram acondicionados em tubos de polipropileno contendo aproximadamente 0,9 g de material e submetidos ao congelamento a −80 °C durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas (L101, Liobras, Brasil) a −55 °C por 48 horas para remoção completa da fase aquosa.

A avaliação da citotoxicidade foi realizada de acordo com a norma ISO 10993-5, utilizando fibroblastos murinos L-929 e o ensaio colorimétrico XTT. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e semeadas em placas de 96 poços na densidade aproximada de 1×10^4 células por poço. Após 24 horas de incubação, as células foram expostas a dez concentrações do hidrogel liofilizado, variando de 0,03 a 2 mg/mL, obtidas por diluições seriadas na proporção 1:1. Foram utilizados controles negativos (sem tratamento) e positivo (dimetilsulfóxido – DMSO 10%). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Varredura de amplitude – Coesividade

No ensaio de varredura da amplitude foi possível determinar a coesividade dos géis (Figura 1). A coesividade é definida como a tendência que o material possui de manter a sua forma quando submetido à uma deformação ou tensão.

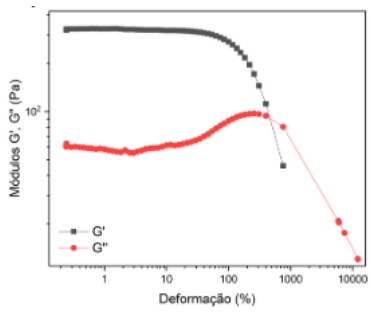


Figura 1. Curvas de Varredura de Amplitude

A análise de coesividade revelou adequada integridade estrutural do gel frente à deformação. O perfil de viscosidade apresentou comportamento pseudoplástico.

Viscoelasticidade do Gel de Hialuronato de sódio Modificado

A Figura 2 mostra o comportamento de G´e G" em relação à variação da frequência.

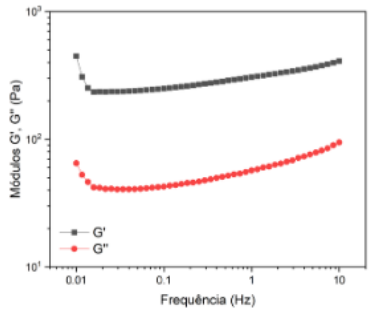


Figura 2. Módulos G' e G" (G' – curva preta; G" – curva vermelha) do produto

A figura 3 apresenta o comportamento de tan δ em função da variação da frequência para o produto analisado

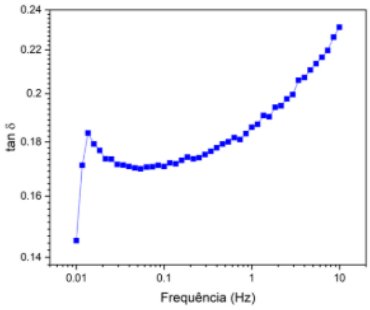


Figura 3. Curva de tan δ do produto analisado

Viscosidade do Gel de Hialuronato de sódio Modificado

A análise reológica de viscosidade é essencial para compreender o comportamento de escoamento do material sob diferentes condições de cisalhamento. Na Figura 4, são apresentados os resultados obtidos, visando avaliar a resposta do material e suas características de fluxo.

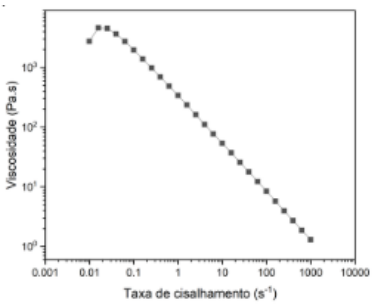
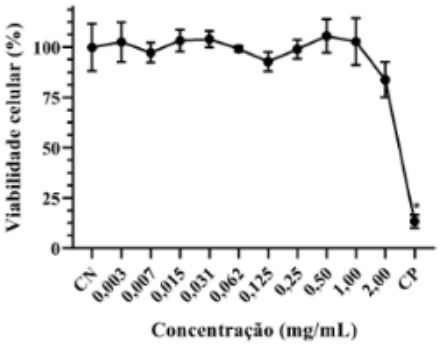


Figura 4. Curva de fluxo do gel de Hialuronato de sódio

Nos ensaios biológicos, todas as concentrações avaliadas apresentaram viabilidade celular superior a 80%, sendo classificadas como não citotóxicas segundo a ISO 10993-5.



Esses resultados sugerem adequada biocompatibilidade e reforçam o potencial do DVS como alternativa promissora ao BDDE.

CONCLUSÃO

Os hidrogéis de ácido hialurônico reticulados com divinilsulfona (DVS) apresentaram propriedades reológicas adequadas para aplicações como preenchedores dérmicos, caracterizadas por comportamento viscoelástico estável, boa coesividade e perfil pseudoplástico favorável à aplicação clínica. Adicionalmente, os ensaios de citotoxicidade demonstraram elevada viabilidade celular, indicando ausência de efeitos tóxicos relevantes nas condições avaliadas.

Dessa forma, os resultados sugerem que o DVS representa uma alternativa promissora aos agentes reticulantes tradicionalmente empregados em preenchedores de ácido hialurônico, reunindo características mecânicas e biológicas compatíveis com o desenvolvimento de biomateriais destinados à estética regenerativa. Contudo, investigações adicionais são necessárias para confirmar seu desempenho em condições que reproduzam de maneira mais fiel o ambiente fisiológico.

AGRADECIMENTOS

À FOA/UNESP, à Biosmart Nanotechnology e aos colaboradores envolvidos no desenvolvimento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

BORZACCHIELLO, A. et al. Hyaluronic acid-based hydrogels for regenerative medicine applications.

BioMed Research International, v. 2015, Article ID 871218, 2015.

BROWN, M. B.; JONES, S. A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, v. 19, n. 3, p. 308–318, 2005.

BURDICK, J. A.; PRESTWICH, G. D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. Advanced Materials, v. 23, n. 12, p. H41–H56, 2011.

COSTA, A. et al. Características reológicas de preenchimentos dérmicos à base de ácido hialurônico antes e após fluxo por agulhas. Surgical & Cosmetic Dermatology, v. 5, p. 88–91, 2013.

DE BOULLE, K. et al. A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. Dermatologic Surgery, v. 39, n. 12, p. 1758–1766, 2013.

EDSMAN, K. et al. Properties of hyaluronic acid dermal filler gels. Dermatologic Surgery, v. 38, p. 1170–1179, 2012.

FAGIEN, S. et al. Rheologic and physicochemical properties used to differentiate injectable hyaluronic acid filler products. Plastic and Reconstructive Surgery, v. 143, n. 4, p. 707e–720e, 2019.

FALCONE, S. J.; BERG, R. A. Crosslinked hyaluronic acid dermal fillers: a comparison of rheological properties. Journal of Biomedical Materials Research Part A, v. 87, p. 264–271, 2008.

FLYNN, T. C. et al. Comparative histology of intradermal implantation of monophasic and biphasic hyaluronic acid fillers. Dermatologic Surgery, v. 37, p. 637–643, 2011.

GOLD, M. H. Use of hyaluronic acid fillers for the treatment of the aging face. Clinical Interventions in Aging, v. 2, n. 3, p. 369–376, 2007.

KENNE, L. et al. Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels: definitions and analytical methods. Carbohydrate Polymers, v. 91, n. 1, p. 410–418, 2013.

LAURENT, U. B. G.; REED, R. K. Turnover of hyaluronan in tissues. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 7, n. 2, p. 237–256, 1991.

MONTICELLI, D. et al. Chemical characterization of polyethylene glycol crosslinked hydrogels for soft tissue augmentation. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, v. 7, n. 7, p. 1077–1081, 2019.

ÖHRLUND, J. Å.; EDSMAN, K. L. M. The myth of biphasic hyaluronic acid fillers. Dermatologic Surgery, v. 41, Suppl. 1, p. S358–S364, 2015.

PIERRE, S.; LIEW, S.; BERNARDIN, A. Basics of dermal filler rheology. Dermatologic Surgery, v. 41, Suppl. 1, p. S120–S126, 2015.

SCHANTÉ, C. E. et al. Improvement of hyaluronic acid enzymatic stability by the grafting of amino acids. Carbohydrate Polymers, v. 87, n. 3, p. 2211–2216, 2012.

SCHIRALDI, C. Biotechnological production and application of hyaluronan. In: SCHIRALDI, C.; LA GATTA, A.; DE ROSA, M. (ed.). Biopolymers. Rijeka: InTech, 2010. cap. 20.

SHMIDOV, Y. et al. Effect of crosslinker topology on enzymatic degradation of hydrogels. Biomacromolecules, v. 21, n. 8, p. 3279–3286, 2020.

STERN, R. et al. The many ways to cleave hyaluronan. Biotechnology Advances, v. 25, n. 6, p. 537–557, 2007.

SUNDARAM, H. et al. Rheological characteristics of soft tissue fillers and their clinical implications. Dermatologic Surgery, v. 36, Suppl. 3, p. 1859–1865, 2010.

WONGPRASERT, P.; DREISS, C. A.; MURRAY, G. Assessment of hyaluronic acid dermal fillers: a critique of current characterization methods. Dermatologic Therapy, v. 35, e15453, 2022.

YEOM, J. et al. Effect of cross-linking reagents for hyaluronic acid hydrogel dermal fillers on tissue augmentation and regeneration. Bioconjugate Chemistry, v. 21, n. 2, p. 240–247, 2010.